جداسازی ژن تنظیم کننده تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین(*strR*) با PCR

فرشاد درویشی هرزویلی، ناصرگلبانگ، زهره حجتی و مجید متولی باشی

دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸٤/۰۷/۰۵ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰۱/۲٦

چکیده

استرپتومایسین یک آنتی بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است که توسط باکتری استرپتومایسس گریزئوس تولید می شود. ژنتیک تولید استرپتومایسین بخوبی در استرپتومایسس گریزئوس مشخص شده است. دسته ژنی *str* با بیش از ۲۵ ژن، اعمال مختلف بیوسنتزی، تنظیمی و ترشح آنتی بیوتیک استرپتومایسین را انجام می دهد. هدف اصلی این تحقیق افزایش میزان تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین با استفاده از استرپتومایسس ترانس ژنیک است. بدین منظور، ژن تنظیم کننده تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین(*str*R) مورد نیاز است. در این تحقیق DNA از باکتری استرپتومایسس گریزئوس جدا و خالص شد. پرایمرهای مختلفی برای رسیدن به هدف تحقیق طراحی و سپس با تکنیک PCR ژن *str*R تکثیر گردید. صحت محصول PCR یعنی ژن *str*R با تکنیکهای Nested-PCR و PCR-RFLP بررسی شد.

واژه های کلیدی: استرپتومایسین، استرپتومایسس گریزئوس، ژن *strR*، PCR.

مقدمه

استرپتومایسس سرده ای (جنسی) از باکتریهای رشته ای گرم مثبت با GC بالا در DNA است (۵ و۱۰). سرده استرپتومایسس ۷۵ درصد آنتی بیوتیکهای طبیعی و دامنه وسیعی از سایر متابولیتهای ثانویه بر ضد عوامل انگلی، قارچی و همچنین ضد تومور و علف کش را تولید می کند (۱، ۲ و۳). یکی از گونه های سرده استرپتومایسس، *Streptomyces griseus* است که بعلت توانایی در تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین، تشکیل اسپور در محیط مایع با محدودیت غذایی و فقر فسفاتی (۱۱ و۱۲) وتولید یک هورمون میکروبی به نام فاکتورA (A-factor) بعنوان گونه منحصر به فرد این سرده محسوب می شود (۷). فاکتورA با هورمونهای یوکاریوتی تشابه دارد، زیرا دارای گیرنده کاملاً اختصاصی است و باعث بیان چندین فنوتیپ نظیر تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین و پیگمان، مقاومت به استرپتومایسین، تشکیل میسلیوم هوایی و اسپور در غلظت پایین 10^{-9} M می شود(١٤).

استرپتومایسین از دسته آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی است. این دسته از نظر ساختمان شیمیایی، خصوصیات ضد میکروبی، اثرات فارماکولوژیک و سمی شبیهند. تمامی آمینوگلیکوزیدها از سنتز پروتئین جلوگیری می کنند بدین نحو که مانع عمل زیر واحد ۳۰S در ریبوزم باکتری می شوند. از آمینوگلیکوزیدها بر ضد باکتریهای گرم منفی روده ای و در درمان اندوکاردیت ناشی از انتروکوک یا برخی از باکتریهای گرم منفی بطور وسیعی استفاده می شود. استرپتومایسین بر تعدادی از باکتریهای گرم منفی و مثبت اثر باکتری کشی دارد. اهمیت فوق العاده استرپتومایسین بخاطر تأثیر آن بر میکروب بیماری سل است (١٦). کندیسیدین، نوبیوسین، سیکلوهگزامید وکروموماسین A آنتی بیوتیکهای دیگری هستند که توسط *S. griseus* تولید می شود (۸ و۹). نقشه فیزیکی ژنوم *S. griseus* با استفاده از آنزیمهای محدود الاثر *Dra*I و *Ase*I مشخص کرد که این گونه یک کروموزم خطی به اندازه ۷/۸ Mb دارد (۱۳).

Archive of SID
www.SID.ir

دسته ژنی بیوسنتز کننده استرپتومایسین با بیش از ۲۵ ژن کنترل اعمال بیوسنتز، تنظیم، مقاومت و انتقال در *Streptomyces griseus* N2-3-11 را برعهده دارد، و ژن *str*R یکی از ژنهای دسته ژنی بیوسنتزی آنتی بیوتیک استرپتومایسین است (٤). پروتئین StrR فعال کننده ویژه نسخه برداری در مسیر تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین است که باعث بیان دسته ژنی استرپتومایسین برای بیوسنتز استرپتومایسین از گلوکز می شود (۱۵و۱۷).

در این تحقیق با استفاده از روش PCR و طراحی پرایمرهای مناسب، ژن *str*R از *S. griseus* عامل تولیدکننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین جدا شد. هدف نهایی آنست که در آینده آن را به حامل مناسب برای ترانسفورماسیون استرپتومایسس مورد نظر انتقال داده تا بتوان میزان تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین را افزایش داد.

مواد و روشها

سویه باکتری: ازسویه باکتری استاندارد *Streptomyces griseus* در این تحقیق استفاده شد. برای استخراج DNA، باکتری در محیط کشت مایع YEME حاوی ۳ گرم Difco Yeast Extract، ۵ گرم Difco Bacto-Peptone، ۳ گرم Oxoid Malt Extract، ۱۰ گرم گلوکز،۳٤۰ گرم سوکروز در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با ۷ =pH در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بمدت ۷- ۵ روزه کشت شد(٦).

استخراج DNA : برای استخراج DNA از کیت High Pure PCR Template Preparation شرکت Roche آلمان استفاده شد. پس از رشد باکتری، ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری در یک میکروتیوپ استریل با دور ۸۰۰۰rpm بمدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد. بعلت بالا بودن ترکیبات قندی (سوکروز) محیط کشت YEME توده سلولی باکتری چند بار با آب مقطر استریل شستشو و سانتریفیوژ گردید. DNA باکتریایی طبق دستور کیت استخراج ، خلوص آن با الکتروفورز در ژل ۰/۷ درصد آگاروز و اسپکتروفتومتر بررسی، و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

پرایمرها: دراین تحقیق با توجه به هدف نهایی مطالعه که کلون کردن ژن *str*R در یک حامل مناسب است، با در نظر گرفتن خصوصیات ژن *str*R و ویژگیهای حامل، دو دست پرایمر اختصاصی با جایگاههای برش جهت دو آنزیم محدود الاثر *Bam*HI و *Xba*I در دو انتهای قطعه ژن مورد نظرو یک جفت پرایمراختصاصی برای تأئید آنها با نرم افزار OLIGO (version 5, W. Rychlik) طراحی شد (جدول ۱).

جدول ۱: پرایمر و مشخصات آنها

نام پرایمر		توالی پرایمر	کاربرد واندازه قطعه موردنظر
strR1	**F**	5′ CCC CGA GCA AGT CCG TGA GA 3′	برای شناسایی قطعه ژن *strR* bp (نستد پرایمر) ۹۹۲
	R	5′ CGA TGC CGG CCT GGT CCA GTT 3′	
strR2	**F**	5′ GCC C*GG ATC C*CC GGG TGC TAC TAT TC3′	برای همانند سازی قطعه ژن *strR* با جایگاههای برش آنزیمی ۱۱۸۹ bp
	R	5′ GGT *CTA GAG* CCG ACG CTC CTC AAC T 3′	
strR3	**F**	5′ GAT *CTA GAG* GTG CTA CTA TCC GCG 3′	برای همانند سازی قطعه ژن *strR* با جایگاههای برش آنزیمی ۱۱۸٤ bp
	R	5′ GGC *GGA TCC* TCC TCA ACT CCG TCG 3′	

Archive of SID
www.SID.ir

PCR : تکنیک PCR با استفاده از آنزیم پلیمراز*Pfu* ، پرایمرهای اختصاصی و نمونه DNA استخراج شده بر اساس جدول (۲) با دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه زیر، حاصل بهینه سازیهای متعدد، صورت گرفت: دناتوره اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه و سپس ۲۵ دوره بترتیب با دمای دناتوره ۹٤ درجه سانتی گراد بمدت ٤۵ ثانیه و دمای چسبیدن ٦٦ درجه سانتی گراد برای پرایمرهایstrR1 و ٦۲ درجه سانتی گراد برای پرایمرهای دیگر(strR**3** وstrR**2**) بمدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۱ دقیقه انجام شد و در انتها تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR با الکتروفورز در ژل ۰/۷ درصد آگاروز بررسی شد.

جدول ۲: مواد و مقدار مورد نیاز برای یک **PCR** به حجم ۵۰ میکرولیتر

نوع ترکیب	حجم	غلظت
Template DNA	1 µl	50 ng
Upstream primer	1 µl	20 pM
Downstream primer	1 µl	20 pM
dNTP Mix	2 µl	10 mM
DMSO	4 µl	-
10 x PCR buffer with $MgSo_4$	2 µl	200mM Tris-HCl, 100mM $(NH_4)_2SO_4$, 100mM KCl, 1% Triton X-100, 1mg/ml BSA, 20mM $MgSO_4$
Pfu polymerase	0.3 µl	2.5 u /µl
deionised dH_2O	Up to 50 µl	-

هضم آنزیمی: برای هضم آنزیمی با آنزیم محدود الاثر، به یک میکروتیوپ ۵ میکرگرم از نمونه DNA بهمراه ۵ – ۱۰ واحد آنزیم اضافه شد وحجم نهایی با بافر x ۱ به ۱۰ میکرولیتر رسید. میکروتیوپ حاوی مخلوط واکنش بمدت ۳-۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بن ماری قرار گرفت تا هضم آنزیمی کامل گردد. محصول هضم آنزیمی با الکتروفورز در ژل ۲ درصد آگاروز بررسی شد.

نتایج

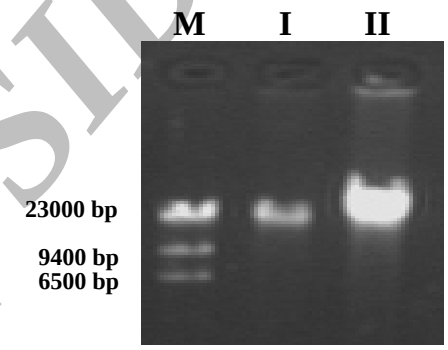
DNA باکتری *S. griseus* با استفاده از کیت جدا و خالص شد ، سپس میزان و خلوص DNA استخراج شده با الکتروفورز در ژل ۰/۷ درصد آگاروز بررسی گردید که نتایج در شکل (۱) مشاهده می شود.

تکنیک PCR با استفاده از آنزیم پلیمراز*Pfu* ، پرایمرهای اختصاصی(strR**3** وstrR**2**) و نمونه DNA استخراج شده صورت گرفت. محصولات PCR با الکتروفورز در ژل ۰/۷

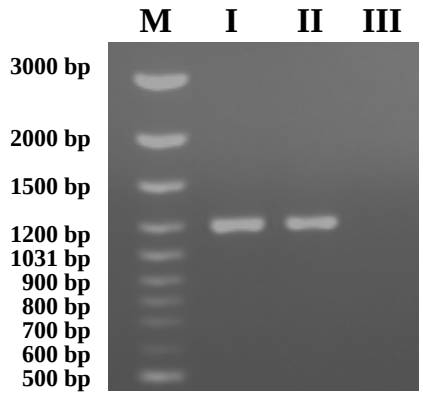
Archive of SID
www.SID.ir

درصد آگاروز بررسی شد که نتایج در شکل (۲) مشاهده می شود.

جهت اثبات تشخیص درست ژن *str*R که با PCR شناسایی و جداسازی شده است، دو راهکار مختلف بکار گرفته شد. در راهکار اول محصولات حاصل از PCR ژن *str*R با پرایمرهای اختصاصی (strR2 وstrR3) با استفاده از یک جفت پرایمر داخلی (strR1) تکثیر شد که این عمل Nested-PCR نامیده می شود. نتایج Nested-PCR در شکل (۳) مشاهده می شود.

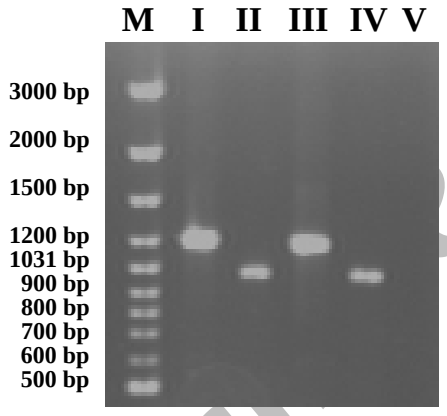


شکل ۱: DNA استخراج شده از باکتری *S. griseus* . نمونه های I و II. DNA باکتری *S. griseus* ، M. مارکر(Lambda DNA/HindIII Marker)



شکل۲: نتایج PCR ژن *str*R با استفاده از پرایمرهای اختصاصی(strR3 وstrR2). I. محصول حاصل از PCR ژن *str*R با استفاده از پرایمرهای strR2. II. محصول حاصل از PCR ژن *str*R با استفاده از پرایمرهای strR3. III .کنترل منفی. M. مارکر (Gene Ruler ^{TM} 100 bp DNA ladder).

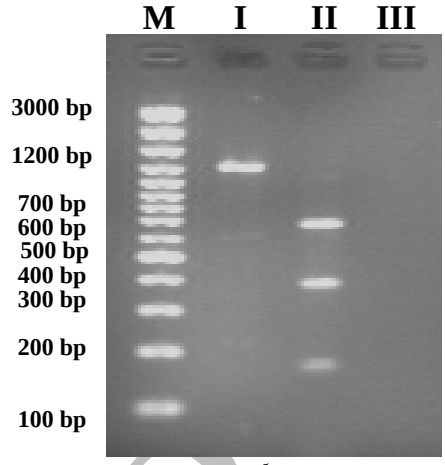
دومین راهکار که PCR-RFLP نامیده می شود هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR یعنی ژن *str*R با پرایمرهای اختصاصی (strR2 وstrR3) با یک آنزیم محدود الاثر است. برای هضم آنزیمی ژن *str*R از آنزیم محدود الاثر *Alu*I استفاده شد. این آنزیم محصولات حاصل از PCR ژن *str*R را در دو محل یعنی ٦٦٥ و ۱۰۳۷ برش می دهد و سه قطعه در اندازه های bp ٦٦٥،۳۷۲ و۱۵۲ ایجاد می کند. آنزیم دیگری به نام *Bgl*II، برای هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن *str*R بکار گرفته شد که این ژن را برش نمی دهد. نتایج حاصل از هضم آنزیمی ژن *str*R با این آنزیم در محدود الاثر، *Alu*I و *Bgl*II ، پس از الکتروفورز با ژل ۲ درصد آگاروز در شکل (٤) مشاهده می شود.



شکل ۳ : نتایج Nested-PCR محصولات حاصل از PCR ژن *str*R با پرایمرهای اختصاصی (strR1). I. محصول حاصل از PCR ژن *str*R با استفاده از پرایمرهای strR2، II. Nested-PCR با پرایمر نستد (strR1) محصول حاصل از PCR ژن *str*R با استفاده از پرایمرهای strR2، III. محصول حاصل از PCR ژن *str*R با استفاده از پرایمرهای strR3، IV . Nested-PCR با پرایمر نستد (strR1) محصول حاصل از PCR ژن *str*R با استفاده از پرایمرهای strR3،V.کنترل منفی، M. ما رکر (Gene Ruler ^{TM} 100 bp DNA ladder).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل٤ : نتایج حاصل از هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن *str*R با آنزیم محدود الاثر *Alu*I . I. هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن *str*R با آنزیم محدود الاثر *Bgl*II، II. هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن *str*R با آنزیم محدود الاثر *Alu*I، III .کنترل منفی، M. مارکر (Gene Ruler ™ 100 bp DNA ladder).

بحث

برخی از ژنهای دسته ژنی بیوسنتز کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین و از جمله ژن *str*R در سال ۱۹۸۷ توسط دیستلر و همکارانش تعیین توالی شد(٤). این ژن عامل کد نمودن پروتئین StrR بعنوان فعال کننده ویژه نسخه برداری مسیر تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین است و در نتیجه موجب بیان دسته ژنی استرپتومایسین در جهت بیوسنتز استرپتومایسین از گلوکز می شود (۱۷). از آنجایکه ژن *str*R بعنوان راه انداز و تنظیم کننده دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین است و همچنین بعلت بزرگ دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین و مبدأ همانندسازی متفاوت که نمی توان آن را در میزبان دیگری بجز استرپتومایسس کلون کرد، و درصورت کلون کردن ژنها ناپایدار خواهند بود، درنتیجه برای اولین بار ایده استفاده از ژن تنظیم کننده دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین(*str*R) بمنظور دستکاری ژنتیکی و بالا بردن تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین در *Streptomyces griseus* را مطرح نمودیم.

در گام اول می بایست ژن *str*R شناسایی و به میزان زیادی همانندسازی و خالص شود تا در مراحل بعد برای دستکاری ژنتیکی استفاده گردد. بهمین منظور در این تحقیق ابتدا با در نظر گرفتن خصوصیات ژن *str*R و ویژگیهای حامل، دوجفت پرایمر اختصاصی(strR2 وstrR3) با جایگاههای برش برای دو آنزیم محدودالاثر *Bam*HI و *Xba*I در دو انتهای قطعه ژن مورد نظرو یک جفت پرایمراختصاصی برای تأئید آنها (strR1) با نرم افزار OLIGO طراحی شد.

DNA باکتری *S. griseus* را با استفاده از کیت جداسازی و خالص نمودیم (شکل ۱) و سپس ژن *str*R با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (strR2 وstrR3) و آنزیم پلیمراز*Pfu* به روش PCR تکثیر شد. استفاده از آنزیم پلیمراز *Pfu* به خاطر خاصیت تصحیح کنندگی آن وجلوگیری از اشتباهات در هنگام همانندسازی ژن بود. بعلت میزانGC بالا در ژنوم استرپتومایسس، بهینه سازی PCR به سختی انجام شد (شکل ۲).

برای استفاده از محصولات حاصل از PCR ژن *str*R به منظور کلون کردن و دستکاری ژنتیکی می بایست از صحیح بودن همانندسازی ژن *str*R مطمئن شد، باین منظور دو روش بکار گرفته شد:

اولین روش تکثیر محصولات حاصل از PCR ژن *str*R با پرایمرهای اختصاصی (strR2 وstrR3) بوسیله یک جفت پرایمر داخلی (strR1) است (شکل ۳).

دومین روش هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن *str*R با پرایمرهای اختصاصی (strR2 وstrR3) با یک آنزیم محدود الاثر مورد می باشد. با توجه به اینکه این پرایمرها (strR2 وstrR3) محصول تقریباً مشابه ای با جایگاهها برش عکس هم دارند، محصول یکی از آنها یعنی محصول حاصل از PCR ژن *str*R با پرایمرهای اختصاصی (strR2) مورد استفاده در مراحل بعدی تحقیق یعنی برای هضم آنزیمی ژن *str*R با آنزیم محدود الاثر

Archive of SID
www.SID.ir

*Alu*I قرار می گیرد. این آنزیم محصولات حاصل از PCR ژن *str*R را در دو محل یعنی ٦٦٥ و ۱۰۳۷ برش می دهد و سه قطعه در اندازه های bp ٦٦٥،۳۷۲ و۱۵۲ ایجاد می کند(شکل٤).

نتایج حاصل از نستد PCR و هضم آنزیمی با آنزیم محدود الاثر محصولات حاصل از PCR ژن *str*R ، ثابت کرد که تکثیر ژن *str*R صحیح صورت گرفته است ولی برای اطمینان بیشتر در ادامه مطالعات محصولات حاصل از PCR ژن *str*R باید تعیین توالی شود. ژن *str*R شناسایی و جداسازی شده، دارای دوجایگاه تشخیص آنزیمی است که از این طریق می توان در آینده نزدیک ژن *str*R را وارد یک حامل بیان کننده مناسب در استرپتومایسس کرد. در مرحله بعد احتمالاً قادر خواهیم بود با وارد کردن حامل به استرپتومایسس گریزئوس منجر به افزایش میزان تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین در شرایط کنترل شده شویم.

درکشور ما تلاشهای اندکی در زمینه افزایش بهره وری تولید آنتی بیوتیکها صورت گرفته است. یکی از دلایل عمدهٔ عدم پیشرفت در این زمینه، فقدان سویه هایی با قدرت تولیدکنندگی بالای آنتی بیوتیک بمنظور بهره برداری صنعتی و اقتصادی است. با توجه به مطالب فوق، اهمیت و کاربرد نتایج این تحقیق گامی مؤثر در جهت ایجاد سویه های مهندسی ژنتیک شده برای تولید آنتی بیوتیک است.

سپاسگزاری: از تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایتهای بی دریغشان سپاسگزاریم و بر خود لازم میدانیم از جناب آقای دکتر حمید میرمحمد صادقی و سرکار خانم مؤذن و سایر کارشناسان محترم گروه بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و سرکار خانم محمدی زاده کارشناس محترم گروه زیست شناسی به خاطر همکاری و کمکهای ارزنده شان نیز تشکر و قدردانی نماییم.

منابع

1- Bibb, M.J. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Microbiology 142: 1335-1344.

2- Bltz, R. H. 1998. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. Trends in Microbiology 6 (2): 76-83.

3- Chater, K. F. 1998. Taking a genetic scalpel to *Streptomyces* colony. Microbiology 144: 1465-1478.

4- Egan, Sh., Wiener, P., Kallifidas, D. and Wellington, E. M. H. 1998. Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within Streptomycetes isolated from soil. Appl. Environ. Microbial. 64 (12): 5061-5063.

5- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kiser, T. and Chater, K. F. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. PNAS, 100 (4): 1541-1546.

6- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton C, Kieser HM, Lydiate D L, Smith CP, Ward JM, Schrempf H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.

7- Horinouchi, S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Frontiers in Bioscience 7: 2045-2057.

8- Ja, G. 2003. Candicidin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. Appl. Environ. Microbial. 60 (3): 633-642.

9- Kawase, T., Saito, A., Kanai, R., Fuji, T., Nikaidou, N., Miyashita, K. and Watanabe, T. 2004. Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinasese in Actinobactria. Appl. Environ. Microbial. 70 (2): 1135-1144.

10- Keijser, B., Wezel, G., Cnters, G. and Vijgenboom, E. 2002. Developmental regulation of the *Streptomyces lividans ram* genes: involvement of RamR in regulation of the

Archive of SID
www.SID.ir

*ram*CSAB opron. J. Bacteriol. 184(16): 4420–4429.

11- Kelemen, G. H., and M. J. Buttner. 1998. Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. Curr. Opin. Microbiol. 1:656–662.

12- Kendrick, KE, Ensign JC. 1983. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. J. Bacteriol. 155: 357-366.

13- Lezhava A, Mizukami T, Kajitani T, Kameoka D, Redenbach M, Tonkawa H, Nimi O, Kinashi H. 1995. Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 177: 6492-6498.

14- Miyake K, Yoshida M, Chiba N, Mori K, Nogawa N, Beppu T, Horinouchi, S. 1989. Detection and properties of the A-factor-binding protein from *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 171:4298–4302.

15- Onaka, H. and Horinouchi, S. 1997. DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences. Mol. Microbiol. 24: 991– 1000.

16- Vakulenko, S. B. and Mobashery, Sh. 2003. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. Clinical Microbiology Reviews (16) 3: 430–450.

17- Vujaklija, D., Horinouchi, S. and Beppu, T. 1993. Detection of an A-factor-responsive protein that binds the upstream activation sequence of *str*R, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 175 (9):2652-2561.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation of the Streptomycin antibiotic production regulatory gene (*str*R) by PCR

Darvishi F., Golbang N., Hojati Z. and Motovali-bashi M.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Isfahan Univ., Isfahan, Iran.

Abstract

Streptomycin is an aminoglycosidic antibiotic that is produced by *Streptomyces griseus*. The genetics of streptomycin production is well known in *Streptomyces griseus*, for which more than 25 clustered genes have been described that encode biosynthesis, regulatory and transport functions. The main goal in this research was production of elevated levels of streptomycin, using transgenic *Streptomyces*. To gain this, the regulatory gene for streptomycin production (*str*R) was needed. In this research DNA was extracted and purified from *Streptomyces griseus*. Different sets of primer were designed for this research purpose and then the *str*R gene was amplified by PCR. Identify of PCR product of *str*R gene, was confirmed using gel electrophoresis, Nested-PCR and PCR-RFLP techniques.

Keywords: streptomycin, *Streptomyces griseus*, *str*R, PCR.

Archive of SID

www.SID.ir